

酸化ストレスに強いカビと細菌のストレス耐性機構

梶尾 俊介・土肥 裕希・高谷 直樹*

はじめに

地球上のすべての生物は、さまざまなストレスに曝されながら生命活動を維持している。特に、微生物には、土壌中や動植物の生体内といった我々の身の回りの環境だけでなく、高温や高圧などの極端なストレス環境下で棲息するものもある。微生物が曝されるストレスは、栄養源の枯渇、温度、浸透圧、紫外線、金属、有害物質などさまざまであるが、微生物はこれらのストレスに応答し、それらへの耐性機構を発現させることによって、一定レベルのストレス下でも生育を維持できる。

これまでに、微生物が環境から受けるストレスへの応答機構について盛んに研究されてきたが、その多くが酸化ストレスと関連しているといえよう。活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) や活性窒素種 (reactive nitrogen species, RNS) (表1) は強い酸化力を有しており、DNA、タンパク質、リン脂質などの細胞構成成分を酸化する。したがって、ROSやRNSが細胞内に過剰に蓄積されると強い酸化ストレスを伴う細胞傷害が引き起こされる¹⁾。我々は、微生物の中でもRNSへの抵抗性が高いカビ *Aspergillus nidulans* と、環境中から単離した高度RNS耐性細菌 *Achromobacter denitrificans* を対象として、これらの生育のRNS耐性に関与する新規遺伝子の獲得と解析を進めている。本稿では、これらの知見とあわせて、カビや細菌が発現する酸化ストレスに対する応答機構について概説する。

表1. 活性酸素種および活性窒素種

活性酸素種 (ROS)
スーパーオキシド ($\cdot\text{O}_2^-$)
一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)
ヒドロキシルラジカル ($\text{HO}\cdot$)
ヒドロペルオキシラジカル ($\text{HOO}\cdot$)
アルキルペルオキシラジカル ($\text{ROO}\cdot$)
過酸化水素 (H_2O_2)
アルキルヒドロペルオキシド (ROOH)
活性窒素種 (RNS)
一酸化窒素 (NO)
ペルオキシナイトライト (ONOO^-)

カビの酸化 (ROS) ストレス応答

好気条件下で生育するカビは、他の真核生物と同様にミトコンドリアの電子伝達系やNADPHオキシダーゼなどによって、内因性のスーパーオキシドを生産する。スーパーオキシドはスーパーオキシドジスムターゼによって過酸化水素 (H_2O_2) へと変換された後、カタラーゼやペルオキシダーゼによって H_2O へと変換され無毒化される。また、グルタチオンやチオレドキシンを介した抗酸化系もROSの解毒に重要である²⁾。これらのメカニズムによって、通常の生育時に生じる低濃度のROSによる酸化傷害を防ぐことが可能である。

一方、極度の環境ストレスに曝されるとカビの細胞内にROSが過剰に蓄積し、酸化ストレスが引き起こされる。カビのモデル微生物ともいえる *A. nidulans* は酸化ストレスに応答するための複数の機構を有する。もっともよく知られたものは、AP-1様転写因子NapAによる抗酸化酵素の発現誘導である³⁾。NapAは酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の酸化ストレス応答性の転写誘導因子Yap1pに相当するタンパク質である。NapAは、酸化ストレスに応答して活性化され、カタラーゼ、グルタチオン還元酵素、チオレドキシ還元酵素などの細胞内の主要な抗酸化系酵素をコードする遺伝子の発現を誘導する。*A. nidulans* 以外のカビもNapAと類似のタンパク質遺伝子を有しており、このメカニズムがカビ間で保存された酸化ストレス応答機構であると推察される。これ以外にも、カビはストレス応答性のMAPキナーゼ経路やCCAAT配列結合因子による抗酸化系酵素の発現制御も行う。なお、これらの発現制御機構は個々に機能するのではなく、互いに関与し合いながら、酸化ストレスに応答することが明らかとなってきている。

近年、ROSが、カビの形態分化や二次代謝産物の生産を促すシグナル物質として機能することが分かってきた⁴⁾。これには、カビの形態分化や二次代謝に関わる転写因子VeAが関与している。カビの形態分化は、病原性のカビの感染と密接に関わっていることが知られる。また、一部のカビは抗生物質や抗がん剤などの有用二次代謝産物を生産する。カビのROS応答機構を理解することは、酸化ストレスおよびその応答機構を制御し、産

*著者紹介 筑波大学生命環境系 (教授) E-mail: takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp

業上重要なカビを上手に利用するために重要であると考えられる。

カビの酸化 (RNS) ストレス応答

一酸化窒素 (NO) は、哺乳類において血管拡張や神経伝達などに関与する重要な細胞間シグナル分子として機能する。また、NOは、マクロファージが生体内に侵入した病原菌を駆除するための武器として利用されることから自然免疫においても重要な役割を担っている。病原性のカビは、何らかの機構によってNOによる細胞傷害を回避すると予想されるが、これまで、カビのNO耐性機構に関する知見は少なく、NOジオキシゲナーゼ活性を有するフラボヘモグロビン (FHb) が解毒酵素として知られるのみであった。筆者らは、*A. nidulans* のNO耐性に関わる遺伝子の探索を行っており、最近、NOによって発現誘導されるペプチドを発見し、ニトロソチオネイン (iNT, NO-inducible nitrosothionein) と命名した⁵⁾。iNTは*ntpA* 遺伝子によってコードされる23アミノ酸からなるペプチドで、6つのシステイン残基を含む。iNTはシステイン残基のチオール基を用いてNOを捕捉する。これにより生じるニトロソ化iNTは、チオレドキシン (TrxA) とTrxA還元酵素 (TrxR) の働きにより、還元的に脱ニトロソ化され、iNTが再生される (図1)。iNTの欠損株は野生株に比べNO存在下での生育速度が遅いことから、*A. nidulans*はこのシステムを用いて細胞内のNOを解毒することで、NO耐性を獲得しているといえる。iNTをコードする遺伝子は他のカビにも見いだされており、iNTを介したNO解毒機構はカビに普遍的に分布すると予想される。筆者らは、この他にも、ヘムの生合成に必須なポルホピリノーゲンデアミナーゼを新たなNO耐性因子として見いだした⁶⁾。本酵素は、NO存在下でヘムの生合成を促進させ、細胞内のヘム含量を増加させることによって、ヘムを補酵素とするFHbや

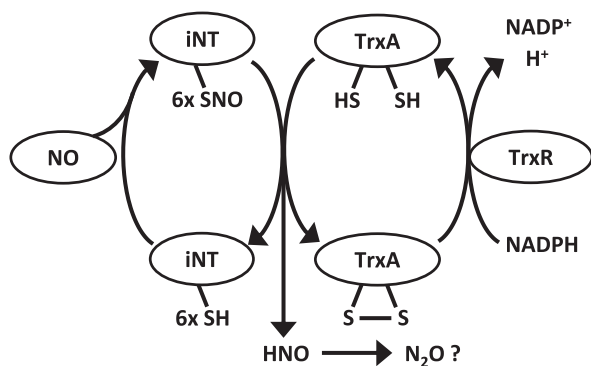


図1. iNTとチオレドキシン系によるNOの解毒モデル。略号は本文参照。

亜硝酸塩還元酵素にヘムを供給する。これにより、NOやNOの発生源となる亜硝酸塩を効率的に除去できると考えられる。

このようにカビは複数のNO解毒機構を有しているが、これらの発現制御機構についての多くは未解明である。NOやNOから生じる他のRNSは、空気中では間接的にROSを発生することから、既知のROS応答性の転写因子がNO解毒機構の発現誘導に関わる可能性は高いだろう。実際、筆者らは、NapAの遺伝子破壊株の生育がNO存在下で著しく阻害されることを見いだしており、その詳細について解析しているところである。また、カビにおいてRNS自体がシグナル分子として機能するかどうかについては未知であり、今後の研究に興味を持たれる。

細菌の環境ストレス応答

細菌のストレス応答性遺伝子の転写調節にはRpoSが中心的な役割を担うことが明らかとなっている⁷⁾。RpoSは σ^{38} または σ^S と呼ばれ、RNAポリメラーゼ (RNAP) に結合し、DNA上で転写を開始する場所を決定する σ 因子の一つである。細胞が酸、高温、高浸透圧、酸化剤などに曝されると、Hfqタンパク質とsmall RNAが*rpoS*をコードしたmRNAに作用してその安定性を向上させ、RpoSの翻訳を促進させる。その結果、RpoSを含むRNAPが増加し、その認識下にある遺伝子の転写量が増加する。RpoS以外のストレス応答性 σ 因子には、熱ストレス応答性のRpoH (σ^{24})、細胞外ストレス応答性のRpoE (σ^{24}) がよく知られている。

細菌の酸化 (ROS, RNS) ストレス応答

カビと同様、細菌も環境から酸化ストレスを受けるとともに、呼吸副産物による内因性の酸化ストレスも受ける。すなわち、ROSは主に酸素呼吸の副産物として発生し¹⁾、RNSであるNOは嫌気呼吸 (脱窒) の中間体として生産される⁸⁾。これらは細胞傷害を引き起こすとともに、最近の筆者らの研究などにより、NADHなどの電子伝達体の酸化によって、細胞内の酸化還元の恒常性を乱し生育を阻害することも明らかとなってきた。

細菌の酸化ストレス応答性の転写制御因子としてOxyRとSoxRSが知られる。これらはRpoD (σ^{70}) を含むRNAPによってある程度恒常的に転写されているが、OxyRはRpoSを含むRNAPによっても転写される。OxyRは過酸化水素に、SoxRSはスーパーオキシドによって活性化され、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、ペルオキシダーゼなどの抗酸化系酵素タンパ

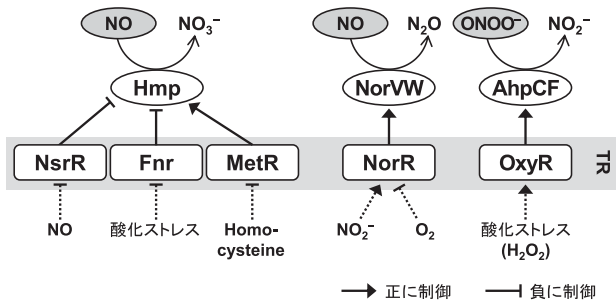


図2. 細菌のRNS解毒酵素の発現誘導モデル. TR, 転写制御因子 (Transcriptional regulator).

ク質の発現量を増加させることで細胞内に生じたROSを無毒化する¹⁾. 一方, NOはNOジオキシゲナーゼ (Hmp) やNOレダクターゼ (NorVW) によって, ペルオキシナイトライトはアルキルヒドロペルオキシドレダクターゼ (AhpCF) によって無毒化される⁹⁾. HmpとNorVWの発現はSoxRSやOxyRとは異なる転写制御因子で制御されており, 大腸菌は, 好気条件下ではHmp, 低酸素条件下ではNorVWを用いてNOを無毒化する(図2)¹⁰⁾. 興味深いことに, HmpやAhpCFがRpoS (σ^{38}) を含むRNAPで転写されるのに対して, NorVWの転写は窒素源の枯渇に反応するRpoN (σ^{54}) を含むRNAPで行われる¹⁰⁾.

細菌の酸化 (ROS, RNS) ストレス耐性化機構

チオレドキシシンやグルタチオンなどのチオール類 (還元型) は, ROSやRNSと直接反応し毒性の低い分子へと変換するとともに, ROSやRNSを還元的に無毒化する抗酸化系酵素の電子供与体として働く¹⁾. この反応に伴って生じる酸化型のチオール類は, それぞれの還元酵素によってNADPH依存的に再び還元型に戻される. このため, 酸化ストレスに曝された細胞は, 平常時よりも多くのNADPHを生育のために必要とする. 一般的に, NADPHはペントースリン酸回路によって生産されるが, トランスヒドロゲナーゼを用いたNADHによるNADP⁺の還元反応によっても生産される. ストレス応答に際してのNADHの役割は不明な点が多かったが, 近年, 我々は, 高度RNS耐性細菌*A. denitrificans*では, TCA回路の活性化を介したNADHの高生産が, ROSやRNSによる酸化ストレスへの耐性化に重要な役割をもつことを示した¹¹⁾.

細菌がROSやRNSに耐性を示すためには, これらによる細胞構成成分の傷害の修復も重要である. たとえば, DNAの酸化損傷の修復は遺伝情報の維持に不可欠である. 一方, 酵素タンパク質が傷害を受けた際には, 代替

酵素が代わりに機能することが多いようである. 鉄硫黄クラスターを活性中心にもつアコニターゼは, この例である. 構成的に発現しているアコニターゼB (AcnB)の鉄硫黄クラスターは, 酸化ストレスに対して非常に脆弱である. 一方, アコニターゼA (AcnA) と呼ばれるグループの鉄硫黄クラスターはAcnBのそれと比較して酸化ストレスに耐性であるため, AcnBが失活する環境下ではこの代替酵素として機能する. 我々は, *A. denitrificans*の高度RNS耐性にもAcnAの機能が必要であることを報告した¹²⁾.

NOはヘムに結合するため, 酸素呼吸の末端酸化酵素であるシトクロム*bo*オキシダーゼなど, ヘム含有酵素タンパク質の機能を総じて低下させる. 大腸菌などでは, 低酸素条件下で発現する末端酸化酵素として発見されたシトクロム*bd*オキシダーゼがNO耐性化に重要であることが示されている¹³⁾. これは, ヘム*d*がヘム*o*と比較して酸素との親和性が高いために, シトクロム*bd*オキシダーゼはNO存在下でも酸素と反応し呼吸を維持できる. これにより, 生育のNO耐性を引き起こす.

まとめ

さまざまな種類のストレスに関する研究が多い中, 高濃度のRNSに対する耐性に着目した研究は, 我々が研究を開始するまでほとんどなかった. 我々は, 高度RNS耐性のカビと細菌のRNS耐性に関わる遺伝子をスクリーニングにより単離し解析するという戦略により, 新たなRNS遺伝子を続々と見いだしている. 今後, これらの機能解析と両微生物でのRNS耐性機構の比較と考察を行うことで, 生物界を越えた普遍的な酸化ストレス応答・耐性機構を解明できると期待している.

文献

- 1) Farr, S. B. and Kogoma, T.: *Microbiol. Rev.*, **55**, 561 (1991).
- 2) Sato, I. et al.: *J. Biol. Chem.*, **284**, 8042 (2009).
- 3) Asano, Y. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1800 (2007).
- 4) Brakhage, A. A.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**, 21 (2013).
- 5) Zhou, S. et al.: *Nat. Chem. Biol.*, **9**, 657 (2013).
- 6) Zhou, S. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 657 (2012).
- 7) Battesti, A. et al.: *Annu. Rev. Microbiol.*, **65**, 189 (2011).
- 8) Zumft, W. G.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 533 (1997).
- 9) Poole, R. K.: *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 76 (2005).
- 10) Gardner, A. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **278**, 10081 (2003).
- 11) Doi, Y. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 1910 (2014).
- 12) Doi, Y. and Takaya, N.: *J. Biol. Chem.*, **290**, 1412 (2015).
- 13) Mason, M. G. et al.: *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 94 (2009).